

硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC0085

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
诱导剂储备液	液体 100 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液	液体 120 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存

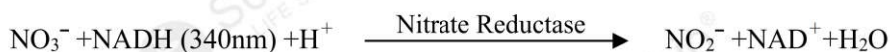
溶液的配制：

- 1、诱导剂储备液：用蒸馏水 10 倍稀释后使用，即取 10mL 诱导剂储备液加 90mL 蒸馏水，充分混匀。现配现用。
- 2、试剂二：临用前加入 2 mL 提取液溶解，可分装后-20℃保存，避免反复冻融。 -20℃保存 2 周。

产品说明：

NR (EC 1.7.1.3) 广泛存在于植物中，是植物硝态氮转化为氨态氮的关键酶，也是诱导酶，对作物的产量和品质有影响。

NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐，NADH 在 340nm 下有特征吸收峰，340nm 下吸光值的变化即可表示酶活。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、取适量诱导剂于烧杯中，将新鲜标本洗净，滤纸吸干，放入诱导剂应用液中（淹没即可）避光，浸泡 2h，取出样本，滤纸吸干后，-20℃冷冻 30min，取出样本，滤纸吸干。（一般不需要诱导处理，预实验结果没有活性则需要诱导处理）
- 2、称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴研磨，4000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定（在 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	空白管
样本	12	-





提取液	68	80
试剂一	108	108
试剂二	12	12

充分混匀后测定 340nm 下的初始值 A1, 25°C (其他物种) 或 37°C (哺乳动物) 反应 30min 后再次测定吸光值 A2, 计算 ΔA 测定管=A1 测定管-A2 测定管, ΔA 空白管= A1 空白管-A2 空白管, $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管。
(空白管只需测 1-2 次)

三、NR 活性计算

1、按微量石英比色皿计算:

(1) 按样本质量计算:

酶活单位定义: 每小时每 g 样本中消耗 1 μ mol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR 活性 (U/g 质量) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 5.359 \times \Delta A \div W$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

酶活单位定义: 每小时每 mg 组织蛋白消耗 1 μ mol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR 活性 (U/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 5.359 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V 反总: 反应体系体积, 2 $\times 10^{-4}$ L; V 样: 吸取样本体积, 0.012mL; V 提取: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 0.5h; ϵ : NADH 的摩尔消光系数, 6220L/mol/cm; d: 微量石英比色皿光径, 1cm; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=10⁶ μ mol。

2、按 96 孔 UV 板计算:

将上述公式中的 d-1cm 换为 d-0.6cm (96 孔 UV 板光径) 进行计算即可。

注意事项:

- 1、当测定的吸光值大于 1.5 或者 ΔA 大于 0.5 时, 建议将上清液稀释后测定。
- 2、 ΔA 测定过小 (小于 0.01), 可延长酶促反应时间。
- 3、建议一次测定不要测定过多样本以免耽误过多的酶促反应时间。
- 4、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔, 正常情况下, 变化不超过 0.05。

实验实例:

- 1、取 0.1g 小叶黄杨加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后再用提取液稀释 2 倍, 之后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定管-A2 测定管=1.4285-1.1089=0.3196, ΔA 空白管=A1 空白管-A2 空白管=0.8794-0.8334=0.046, $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.3196-0.046=0.2736, 按样本质量计算酶活得:
NR 活性 (U/g 质量) = $5.359 \times \Delta A \div W \times 2$ (稀释倍数) = $5.359 \times 0.2736 \div 0.1 \times 2 = 29.3244$ U/g 质量。
- 2、取 0.1g 玉兰加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后再用提取液稀释 2 倍, 之后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定管-A2 测定管=1.4696-1.0602=0.4094, ΔA 空白管=A1 空白管-A2 空白管=0.8794-0.8334=0.046, $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.4094-0.046=0.3634, 按样本质量计算酶活得:
NR 活性 (U/g 质量) = $5.359 \times \Delta A \div W \times 2$ (稀释倍数) = $5.359 \times 0.3634 \div 0.1 \times 2 = 38.9492$ U/g 质量。

相关发表文献:

[1] Zhang J, Liu S, Liu CB, Zhang M, Fu XQ, Wang YL, Song T, Chao ZF, Han ML, Tian Z, Chao DY. Natural variants of molybdate transporters contribute to yield traits of soybean by affecting auxin synthesis. Curr Biol. 2023 Dec 18;33(24):5355-5367.e5. doi: 10.1016/j.cub.2023.10.072. Epub 2023 Nov 22. PMID: 37995699.



[2] Chen C, Chu Y, Huang Q, Zhang W, Ding C, Zhang J, Li B, Zhang T, Li Z, Su X. Morphological, physiological, and transcriptional responses to low nitrogen stress in *Populus deltoides* Marsh. clones with contrasting nitrogen use efficiency. *BMC Genomics*. 2021 Sep 27;22(1):697. doi: 10.1186/s12864-021-07991-7. PMID: 34579659; PMCID: PMC8474845.

[3] Yang J, Zhang G, Peng M, Tan S, Ge S, Yang X, Liang Y, Wen Z, Xie L, Zhou T, Wu S, An J, Wang Y, Liu W, Zhang K, Zhang Z, Liu J, Shi J. Bionic Regulators Break the Ecological Niche of Pathogenic Bacteria for Modulating Dysregulated Microbiome in Colitis. *Adv Mater*. 2022 Sep;34(39):e2204650. doi: 10.1002/adma.202204650. Epub 2022 Aug 26. PMID: 35924734.

[4] Hou Y, Sun J, Wu B, Gao Y, Nie H, Nie Z, Quan S, Wang Y, Cao X, Li S. CPSF30-L-mediated recognition of mRNA m6A modification controls alternative polyadenylation of nitrate signaling-related gene transcripts in *Arabidopsis*. *Mol Plant*. 2021 Apr 5;14(4):688-699. doi: 10.1016/j.molp.2021.01.013. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33515769.

[5] Amanze C, Anaman R, Wu X, Alhassan SI, Yang K, Fosua BA, Yunhui T, Yu R, Wu X, Shen L, Dolgor E, Zeng W. Heterotrophic anodic denitrification coupled with cathodic metals recovery from on-site smelting wastewater with a bioelectrochemical system inoculated with mixed *Castellaniella* species. *Water Res*. 2023 Mar 1;231:119655. doi: 10.1016/j.watres.2023.119655. Epub 2023 Jan 23. PMID: 36706471.

参考文献:

[1] Bories P N, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase[J]. *Clinical Chemistry*, 1995, 41(6): 904-907.

[2] Hageman R H, Hucklesby D P. [45] Nitrate reductase from higher plants[M]//Methods in enzymology. Academic Press, 1971, 23: 491-503.

相关系列产品:

- BC1500/BC1505 植物硝态氮含量检测试剂盒
- BC1520/BC1525 植物氨态氮含量检测试剂盒
- BC1480/BC1485 水土中亚硝酸盐含量测定试剂盒
- BC1490/BC1495 食品中亚硝酸盐含量检测试剂盒
- BC0070/BC0075 谷氨酸合成酶 (GOGAT) 活性检测试剂盒

